



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Kvalitén hos SLC-selekterad hingstsperma

- Mitokondriella membranpotentialen och produktion av ROS

Anne Lagerqvist

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2013:70

Kvalitén hos SLC-selekterad hingstsperma

- Mitokondriella membranpotentialen och produktion av ROS

SLC-selected equine sperm quality

- Mitochondrial membrane potential and ROS-production

Anne Lagerqvist

*Handledare: Jane Morrell, Institutionen för kliniska vetenskaper (KV), Reproduktion
Biträdande handledare: Anders Johannisson, Inst. För anatomi, fysiologi och biokemi*

Biträdande handledare: Anne-Marie Dalin, Inst. för KV

Biträdande handledare: Johanna Lindahl, Inst. för KV

Examinator: Lennart Söderquist, Institutionen för KV

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Kliniska vetenskaper

Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp

*Nyckelord: Single layer centrifugation, hingst, sperma, reaktiva syreföreningar, mitokondriell membranpotential
Key words: Single layer centrifugation, stallion, sperm, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential*

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2013:70

SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY.....	2
INLEDNING.....	4
Mitokondriens energiproduktion.....	6
Färgämnen som kan användas för att utvärdera spermernas viabilitet, reaktiva syreföreningar och mitokondriella membranpotential med flödescytometri	6
MATERIAL OCH METODER.....	8
1. <i>In vitro</i> assay.....	8
<i>Utförande</i>	8
Morfologi och progressiv motilitet	8
<i>Beredning</i>	8
Grundprov.....	8
Single layer centrifugation (SLC)	8
2. <i>Insemineringsförsök</i>	10
Morfologi och progressiv motilitet	10
Statistik.....	11
RESULTAT	12
1. <i>In vitro</i> assay	12
2. <i>Insemineringsförsök</i>	19
DISKUSSION.....	20
SLUTSATS.....	23
TACK.....	23
REFERENSER.....	24

SAMMANFATTNING

Studiens målsättning var att utvärdera kvalitén hos hingstsperma selekterad med hjälp av Single Layer Centrifugation (SLC), med huvudsyftet att studera den mitokondriella membranpotentialen ($\Delta\Psi_m$) och förekomsten av reaktiva syreföreningar (ROS) hos hingstspermier före och efter SLC. Ett insemineringsförsök med SLC selekterad och rutinspädd sperma genomfördes även på ett litet antal ston, men inga slutsatser kunde dras av resultaten.

Humanstudier har visat att spermier med låg $\Delta\Psi_m$ mer frekvent har återfunnits hos män med fertilitetsproblem. Mätning av $\Delta\Psi_m$ har gjorts genom att tillsätta den lipofila JC-1, vilket i både studier på både humana- och ekvina spermier har visat sig vara en känslig metod för att särskilja spermier med låg respektive hög $\Delta\Psi_m$. Det har även visats att förekomsten av ROS bidrar till en fientlig miljö för spermerna och leder till förkortad överlevnadstid.

I denna studie har förekomsten av superoxid och väteperoxid (ROS) i hingstsperma studerats genom att tillsätta divätedichlorofluoresceindiacetat (H_2DCFDA) och hydroethidine (HE). Både $\Delta\Psi_m$ och förekomsten av ROS har studerats med flödescytometri. Ejakulat från 14 hingstar samlades på tre seminstationer, späddes enligt standardrutin och transporterades sedan till Institutionen för kliniska vetenskaper, avd. för reproduktion, SLU, där SLC utfördes enligt en rutinmetod.

Resultatet från denna studie visade att även om JC-1 är en känslig metod för att detektera låg/hög mitokondriell membranpotential ($\Delta\Psi_m$) visade den inte på någon korrelation med andra metoder som används för att bedöma spermiekvalité. Sperma med signifikant högre motilitet och längre överlevnad visade ingen skillnad i $\Delta\Psi_m$ jämfört med spermier med sämre motilitet. Centrifugeringen påverkade inte $\Delta\Psi_m$ men skillnader sågs mellan hingstarna. Vidare visades att SLC-metoden selekterar för spermier med signifikant lägre väteperoxidproduktion. Fler studier behöver göras för att finna orsaken till varför SLC-selekterade spermier uppvisar en signifikant förändrad ROS-produktion.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the quality in stallion sperm samples selected by single layer centrifugation (SLC) with the main focus on studying the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the presence of reactive oxygen species (ROS) in stallion sperm before and after SLC. This study also included an insemination trial, but due to inadequate material no conclusion could be drawn from the result.

Studies on human sperm have shown that low $\Delta\Psi_m$ has been associated with fertility problems in men. It has also been shown in previous studies that the presence of ROS contributes to a hostile environment for the spermatozoa and leads to a shortened lifespan.

In this study ejaculates from 14 stallions were collected and commercial sperm doses were transported to the Department of clinical science, SLU, where SLC and the laboratory analyses were performed. The measurement of $\Delta\Psi_m$ was performed by adding the lipophilic substance JC-1 which has been shown in human and equine research to be a sensitive method to differentiate spermatozoa with low and high $\Delta\Psi_m$. The presence of superoxide and hydrogen peroxide was measured by adding dihydrodichlorofluoresceindiacetate (H_2DCFDA) and hydroethidine (HE). Both $\Delta\Psi_m$ and ROS were analysed by flow cytometry.

Results in this study show that there was no correlation between JC-1 and other fertility measurements even if JC-1 was a sensitive method to detect low/high $\Delta\Psi_m$. No differences in $\Delta\Psi_m$ between samples were seen despite considerable differences in sperm motility and life span. Similarly, $\Delta\Psi_m$ was not influenced by SLC although other parameters of sperm quality were improved by this treatment. However, there were significant differences between stallions. SLC selects sperm with a significantly lower hydrogen peroxide containing sperm than in controls. Further studies need to be done to establish why SLC-selected spermatozoa show a significant change in the pattern of ROS-production.

FÖRKORTNINGAR/ABBREVIATIONS

AI - artificiell insemination
ASVH – Avelsföreningen för svenska varmblodiga hästen
ATP - Adenosintrifosfat
cAMP - cykliskt adenosine monofosfat
H - Hoechst 33258
H₂DCFDA - Divätedichlorofluoresceindiacetat
HE – Hydroethidine
H₂O₂ - Väteperoxid
JC-1 - 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodiden
MEN - Menadione/ 2-metyl-1,4-naphthoquinon
O₂⁻ - Superoxid
PI - Propidium jodid
ROS – Reaktiva syreföreningar
RS- rutinspädd/ocentrifugerad sperma
SLC – Single layer centrifugation
SLU – Sveriges lantbruksuniversitet
 $\Delta\Psi_m$ - mitokondriell membranpotential

INLEDNING

Detta examensarbete är en del av ett större projekt i att kontrollera SLCs effekt på motilitet och överlevnad hos sperman. Huvudfokus i detta arbete var att studera den mitokondriella membranpotentialen och förekomsten av ROS i SLC-selektade hingstspermier och dess effekt på fertiliteten.

Idag vet vi inte tillräckligt om hur den naturliga selektionen går till för att avgöra vilka spermier som kommer att överleva hela vägen och kunna befrukta ägget inne i äggledaren. Vid naturlig betäckning, av exempelvis sto, kommer miljarder av spermier att deponeras i livmodern strax innanför cervix. Under spermiers väg till befruktningsplatsen i äggledaren finns flera regleringar vilket innebär att bara en liten andel av de miljarder spermier som deponerades kommer att vara med i kampen om att befrukta oocyten. Efter spermiedeponeringen ska spermien färdas till äggledaren. Redan efter några minuter kan spermier återfinnas i äggledarna (Rath et al., 2008). Flera faktorer påverkar, huruvida spermien kan ta sig från deponeringsplatsen till äggledaren där befruktning sker, såsom spermiers motilitet, myometriekontraktioner och den naturliga inflammation som uppstår i livmodern efter betäckning hos sto. Det har även visats att spermier som binder till epitelialcellerna i äggledaren förblir viabla längre genom att de intracellulära kalciumnivåerna hålls låga och därmed förhindrar kapacitering (Troedsson et al., 1998). För att spermiers motilitet ska bevaras krävs adenosintrifosfat (ATP) som energikälla. ATP krävs även för andra cellulära reaktioner hos spermien såsom hyperaktivitet, kapacitering och akrosomreaktion (Ramalho-Santos et al., 2009), alla viktiga för spermiers mognadsprocess inför befruktningen. Vid artificiell insemination (AI) lagras spermerna under en längre tid tillsammans med seminalplasman än vad den gör vid naturlig betäckning. Det har visats att om seminalplasman tas bort får hingstspermier en längre överlevnad. Att spermier lagras tillsammans med seminalplasman skulle kunna vara en av anledningarna till varför sämre dräktighetsresultat ses vid insemination med dygns gammal sperma än vid insemination direkt efter samling (Morrell et al., 2010). De spädningssvåtskor som används inom AI idag medför bland annat en utspädning av seminalplasman och hämmar därmed dess dåliga effekt på spermerna (Rota et al., 2004).

Problemen med AI inom hästreproduktion är att hingstspermier har relativt kort överlevnad med dagens transporthantering, samt att aveln framförallt är inriktad på prestation och inte på fruktsamhet (Morrell et al., 2008). Vid transport och kylförvaring ses en signifikant försämring av sperman 24 timmar efter samling jämfört med direkt efter samling, vilket medför ett stort problem (Aurich, 2005). Idag finns dock två olika spermahanteringsmetoder, Density Gradient Centrifugation och Single Layer Centrifugation (SLC), vilka möjliggör att spermier är nästan lika motila och viabla efter 24 timmars lagring i rumstemperatur eller vid +5°C (Morrell et al., 2008). Då SLC bara kräver en sorts kolloid anses den användarvänlig för det dagliga arbetet ute på stuterier och har även visat sig fungera till de volymer sperma som krävs för AI hos häst (Morrell et al., 2009b). SLC har i olika studier visats avlägsna seminalplasman samtidigt som de mest motila och viabla spermerna selekteras fram. Detta sker genom centrifugering av sperman genom en artspecifik kolloid vilken kräver en aktiv transport (Morrell et al., 2008; Morrell et al., 2009a-b).

Majoriteten av hingstarna inom halvblodsaveln (svensk varmblodig ridhäst) i Sverige finns tillgängliga för avel genom AI. År 2012 var 95,5 % av halvblodshingstarna tillgängliga via semin och 97 % av stona blev inseminerade, en ökning sedan 2011 då 94 % av halvblodshingstarna fanns tillgängliga via semin och 93 % av stona inseminerades.

Marknaden i Europa har blivit mer lättillgänglig och fler väljer därmed att transportera sperma från eftertraktade, utländska hingstar i Europa (ASVH, 2012). Enligt betäkningsredovisning till Svensk travsport fanns 92,7% av varmblodstravarnas hingstar 2012 tillgängliga genom AI. För att kunna transportera sperman längre sträckor kyls sperman ner till ca 6°C under transporten. Studier har visat att kvalitén hos sperman ofta försämras mellan samlingstillfället och insemineringen och hingstens spermiekvalité spelar stor roll för hur spermier klarar av hantering, kylning och transporter (Aurich, 2008). Försämringen av spermernas kvalitet efter kylning och transport är ett av de största problemen med AI idag. Även om det inte ännu finns en perfekt metod för spermiehanteringen så har det på senare år gjorts stora framsteg (Aurich, 2005). Rutinmässigt på stuterier undersöks hingstpermiers kvalitet med hjälp av en subjektiv metod, motilitetsbedömning i mikroskop (Graham, 2001). Även om motilitetsbedömningen med hjälp av exempelvis dator-assisterade analyser har förbättrats så finns det fortfarande inte en komplett metod för att avgöra spermernas viabilitet och överlevnadsförmåga.

Spermier består av två anatomiska delar; huvud och svans. Spermiers motilitet är beroende av dess förmåga att producera energi, vilket sker genom oxidativ fosforylering i mitokondrierna som finns i spermiers mittstycke i svansen (Kadenbach, 2009). Hanteringen av sperman vid exempelvis kylning kan påverka funktionen hos spermiers mitokondrier och därmed spermiers förmåga att kunna producera energi nödvändig för att befrukta oocyten (Graham, 2001). Den mitokondriella funktionen kan mätas genom att tillsätta 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodiden (JC-1), som är lipofil. Genom att JC-1 aktivt tas in i cellen kan aktiviteten i mitokondrierna sedan mätas genom ändringarna i mitokondriernas membranpotential ($\Delta\Psi_m$) med hjälp av flödescytometri (Cossarizza et al., 1993; Gravance et al., 1999; Aurich, 2005; Macias Garcia et al., 2011).

Vid hög $\Delta\Psi_m$ och om ATP inte förbrukas lika snabbt som det produceras, bildas det fria syreföreningar, ROS, (Kadenbach, 2009; Votyakova et al., 2001) vilket kan vara en orsak till förlust av integriteten i plasmamembranen, både spermiers – och mitokondriens membran. När ROS bildas bidrar det till en oxidativ stress som skadar cellen och dess funktion, vilket tros vara en orsak till infertilitet. Väteperoxid (H_2O_2) och superoxid (O_2^-) är två exempel på ROS som är skadliga för spermien och minskar överlevnadstiden (Makker et al., 2009). Förekomsten av ROS har hos humana spermier visats korrelera negativt med motiliteten (Kopper et al., 2008). Det är visat att det är spermiers mitokondrier som bidrar med ROS och därmed den oxidativa stress det innebär. Hos humana spermier är det främst de omogna och morfologiskt onormala spermier samt leukocyter som producerar ROS (Koppers et al., 2008; Makker et al., 2009). I försök där askorbinsyra har tillsatts i spädningssvätskan har det setts en förbättring av spermiers membranintegritet genom att förhindra ROS skadliga effekter på membranet (Aurich et al., 1996). En viss mängd ROS behövs dock i ett ejakulat då det visats ha främjande effekter på kapaciteringen av spermien som sker innan befruktning. Under kapaciteringen ökar bland annat cykliskt adenosine monofosfat (cAMP) för att göra spermier hyperaktiva inför befruktningen. Denna ökning av cAMP och produktion av ATP ökar i sin tur även mängden ROS (Makker et al., 2009; Kadenbach, 2009). ROS produktionen, som orsakas av elektrontransportkedjan i mitokondrien, är väldigt känslig för depolarisering av $\Delta\Psi_m$, och hämmar därmed produktionen/förbrukningen av ATP denna ROS-produktion effektivt (Votyakova et al., 2001). Genom att optimera balansen mellan produktionen/förbrukningen av ATP kan $\Delta\Psi_m$ regleras och därmed ROS-produktionen hämmas (Kadenbach, 2009).

En centrifugeringsmetod med en specifik kolloid för hingst, Androcoll-E, har visat sig framgångsrik i att selektera spermier med hög motilitet och normal morfologi. När sperman

centrifugeras genom denna artspecifika kolloid separeras spermier från seminalplasman och de mest motila och viabla spermier ansamlas (Morrell et al., 2010). Single Layer Centrifugation (SLC) -selektade spermier har även längre överlevnad än ocentrifugerade spermier (Morrell et al., 2008; Johannisson et al., 2009) och kan vara befruktningsdugliga upp till 96h efter samlingstillfället (Lindahl et al., 2012).

Mitokondriens energiproduktion

Majoriteten av den energi som en cell använder kommer från molekylen adenosintrifosfat (ATP) vilka produceras av mitokondrierna. Normalt är mitokondrien en ganska mobil organell, men i specifika celler där ATP-konsumtionen är strikt reglerad till en lokalisering, såsom hos spermien, förblir mitokondrien fixerad till en specifik plats. Mitokondrien har två membran runt sig som är avgörande för dess energiproduktion, ett inre och ett yttre membran. Området mellan membranerna kallas för "intermembran space". Området innanför det inre membranet kallas för mitokondriens matrix. Det yttre membranet är permeabelt för molekyler upp till 5000 daltons medan det inre membranet bara tar in selekterade molekyler som aktivt transporteras genom membranet. Det inre membranet innehåller proteiner med tre olika uppgifter: åstadkomma oxidativ reaktion i elektrontransportkedjan, bilda ATPsyntas som gör ATP inne i matrixet, samt produktion av transportproteiner för att transportera metaboliter över membranet.

Det finns tre olika enzymkomplex i elektrontransportkedjan, NADH dehydrogenas komplex, cytochrom b-c1 komplex och cytochrom oxidas komplex, vilka bildar en sorts passage för elektroner genom membranet. Det är dessa enzymkomplex som står för protonpumpningen över membranet genom att elektroner vandrar från ett komplex till nästa för att skapa ett flöde av H^+ + OH^- in i matrixet och protoner ut över membranet. Detta flöde skapar en elektrokemisk protongradient över det inre membranet. Denna protongradient används i sin tur för att driva ATP produktionen genom oxidativ fosforylering. När elektrontransportkedjan pumpar ut H^+ till området mellan membranerna använder enzymet ATPsyntas denna elektrokemiska gradient till att skapa en väg för H^+ att återvända in i matrixet. Återförandet av H^+ in i matrixet är vad som driver ATP att bildas. Det är samma elektrokemiska gradient som möjliggör för ATP att transporteras ut från matrixet igen (Alberts et al., 2004).

Vid normal cellandning pumpas protoner genom det inre membranet vilket bidrar till en spänning – den mitokondriella membran potentialen ($\Delta\Psi_m$). Denna spänning varierar mycket mellan olika typer av celler, samt beroende på vilken energiproduktion cellen behöver. När $\Delta\Psi_m$ ökar över 130mV ökar även protonläckaget genom biologiska membran exponentiellt. Vid högre $\Delta\Psi_m$ än 240mV anses den aktiva protontransporten och protonläckaget vara lika stora. Genom att förbruka det ATP som bildas genom cellandningen kan $\Delta\Psi_m$ minskas igen (Kadenbach, 2009).

Färgämnen som kan användas för att utvärdera spermernas viabilitet, reaktiva syreföreningar och mitokondriella membranpotential med flödescytometri

SYBR 14

SYBR 14 färgar levande celler som då blir synliga i flödescytometern. Färgämnet tränger igenom intakta cellmembran och binder till cellens DNA och avger då en fluorescerande grön färg (Garner & Johnson, 1995).

Propidium jodid (PI)

PI färgar döda celler genom att binda till DNA hos de celler som förlorat sin membranintegritet och fluorescerar då rött. SYBR-14 och PI kan med fördel användas samtidigt (Garner & Johnson, 1995).

Hoechst 33258 (H)

Färgar döda celler och fungerar som en viabilitetsmarkör, genom att färgen tränger in i celler med skadat cellmembran, binder till DNA och fluorescerar blått (Garner et al., 1994). Antalet viabla spermier i ett ejakulat representerar antalet spermier med intakt plasmamembran. Det intakta plasmamembranet gör det möjligt för cellen att hålla vissa molekyler, i detta fall ett färgämne, utanför cellen (Graham, 2001).

Divätedichloroflouresceindiacetat (H₂DCFDA)

Vid förekomst av väteperoxid (H₂O₂) intracellulärt klyvs färgämnet och fångas inne i cellerna och kommer sedan att fluorescera grönt. Beroende på hur mycket väteperoxid som finns inne i cellen kommer det fluorescera olika starkt (Loetchuntinat et al., 2005).

Hydroethidin (HE)

Vid förekomst av superoxid (O₂⁻) oxideras HE till en DNA-bindande fluorofoer och fluorescerar då rött (Benov et al., 1998). I test där HE används kan inte propidiumjodid användas som en markör för döda celler då båda två fluorescerar rött. Därför används Hoechst 33258 som viabilitetsmarkör vid samtidig användning av HE.

Menadione/ 2-metyl-1,4-naphthoquinon (MEN)

Används för att undersöka om spermerna kan producera ROS genom att starta ROS produktionen. Resultatet av stimuleringen blir främst en superoxidproduktion. Superoxiden kan efter bildning omvandlas till väteperoxid antingen spontant eller enzymatiskt (Criddle et al., 2006).

5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin iodid (JC-1)

JC-1 är ett lipofilt ämne som bildar multimerer (J-aggregat) i mitokondrier med hög membranpotential och monomerer (M-Band) i mitokondrier med låg membranpotential. JC-1 skiljer därmed ut mitokondrier med hög respektive låg membranpotential genom att de med hög membranpotential fluorescerar med orange färg och de med låg membranpotential fluorescerar med grön färg (Gravance C.G. et al., 1999).

SYFTE MED STUDIEN

Det fanns två syften med denna studie:

1. In vitro assay

Utvärdera effekten på den mitokondriella membranpotentialen och produktionen av reaktiva syreföreningar i hingstejakulat som centrifugerats enligt SLC-metoden jämfört med ocentrifugerade ejakulat.

2. Insemineringsförsök

Utvärdera skillnaden i dräktighetsstatistik hos ston inseminerade med rutinspädd sperma samt ston seminerade med selekterad sperma (centrifugerad enligt SLC).

Denna studie skiljde sig från tidigare gjorda studier inom samma område genom att nu även sambandet mellan den mitokondriella membranpotentialen och ROS studerades och deras effekt på fertiliteten.

MATERIAL OCH METODER

1. In vitro assay

Ejakulat från 14 hingstar från tre stuterier (seminstationer) samlades, rutinspäckades med INRA96 och skickades kylförvarat via posten eller hämtades (från närliggande stuterier) till inst. för kliniska vetenskaper, avd. reproduktion, SLU, Uppsala. Vid SLU kontrollerades sperman avseende motilitet och späddes med INRA96 till en standardkoncentration av $\leq 100 \times 10^6$ spermier/ml. Femton ml av AI-dosen användes till SLC. Sperman analyserades avseende den mitokondriella membranpotentialen ($\Delta\Psi_m$) och produktionen av reaktiva syreföreningar (ROS).

Försöksetiskt tillstånd är ansökt och godkänt (C345/9).

Utförande

Morfologi och progressiv motilitet

Spermiemotiliteten analyserades med hjälp av NucleoCounter (Chemometec, Danmark). Reagent S100 (5mL) och 50 μ L sperma pipetterades och lades i samma provkopp. En kassett innehållande propidiumjodid användes för att suga upp sperma och reagent S100 för att sedan analyseras i NucleoCounter.

Motiliteten analyserades med hjälp av Computer-assisted motility analyzer – CASA (Spermvision, Minitüb, Tiefenbach, Tyskland). Sperman späddes med INRA96 till en standardspermiemotilitet på 50×10^6 spermier/ml innan analys. Värmeplattan under mikroskopet värmdes upp till 38°C, därefter applicerades 5 μ L sperma på ett objektskglas och ett täckglas (18x18mm) lades försiktigt ovanpå sperman. Inställningar för hingstospermier användes och åtta fält med ca 200 spermier vardera analyserades. Både koncentrations- och motilitetskontrollerna utfördes på spermalaboratoriet vid institutionen för kliniska vetenskaper, SLU.

Beredning

Grundprov

Single layer centrifugation (SLC)

Androcoll-E, 15ml, hällades upp i ett provrör, därefter pipetterades 15-18ml av sperman (koncentration $\leq 100 \times 10^6$ spermier/ml) långsamt ovanpå kolloiden. Efter noggrann kontroll att kolloidlagret inte penetrerats av sperman centrifugerades provet i 20 min vid 300g.

Efter centrifugering pipetterades översta spermalagret bort, utan att penetrera kolloidlagret. Därefter pipetterades kolloidlagret bort utan att få med spermerna som ansamlats i botten av provröret. Spermerna som ansamlats i botten pipetterades upp och späddes med INRA96. Koncentrationen kontrollerades i NucleoCounter innan sperman åter späddes till samma koncentration som den rutinspäckade sperman. SLC utfördes vid institutionen för kliniska vetenskaper, SLU och centrifugering utfördes på samma sätt som vid tidigare studier med SLC (Morrell et al., 2009b; Morrell et al., 2010; Morrell et al., 2012).

Laboratorieanalyser avseende viabilitet, ROS och mitokondriella membranpotentialen utfördes vid institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU, Uppsala.

Test 1 - Viabilitet

Cellwash (BD Biosciences, Becton Dickinson, San José, CA, USA), 270 µl tillsattes till provrören innan 30 µl sperma tillfördes (spädning 100×10^6 spermier /ml, d.v.s cirka tre miljoner spermier/prov). Färgämnet SYBR 14 spädades 50 ggr (24,5 µl Cellwash + 0,5 µl SYBR 14) innan 0,6 µl av SYBR 14 spädningen tillsattes. Tre µl av propidiumjodid (Live/Dead[®] Sperm Viability Kit L-7011; InvitrogenTM, Inc., Eugene, OR, USA) tillsattes innan proven placerades 10 min i värmeskåp vid 37°C innan de analyserades med hjälp av flödescytometri.

Test 2 + 3 - Reaktiva syreföreningar (ROS)

Cellwash (BD Biosciences), 270 µl, tillsattes till provrören innan 30 µl sperma tillfördes (spädning 100×10^6 spermier/ml, d.v.s. 3 miljoner spermier/prov). Nio µl av vardera färgämne H, HE och H₂DCFDA (InvitrogenTM, Inc., Eugene, OR, USA) tillsattes. I test 3 tillsattes även 3 µl av aktivatorn MEN (Sigma-Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA). Proven placerades sedan i värmeskåp vid 37°C i 30 min och analyserades med hjälp av flödescytometri.

Test 4 - Mitokondriella membranpotentialen

Cellwash (BD Biosciences), 1ml tillsattes till provrören innan 50 µl sperma tillfördes (spädning 100×10^6 spermier/ml, d.v.s. 5 miljoner spermier/prov). Innan proven blandades försiktigt tillsattes 0,5 µl av JC-1 (InvitrogenTM), proven placerades därefter i värmeskåp vid 37°C i 40 minuter och analyserades med hjälp av flödescytometri.

Två provrör per hingst och test förbereddes, ett till den ocentrifugerade sperman och ett till den SLC-selekterade sperman. För varje spermaprov och testtillfälle fanns följande prover enligt Tabell 1.

Tabell 1. Tillsats, mängd, koncentrationen och antal spermier för Test 1-4

	Tillsats	Mängd	Koncentration	Antal spermier
Test 1 (Viabilitet)	SYBR-14	0,6 µl	0,4 µM	3 miljoner
	PI	3 µl	24 µM	
Test 2 (ROS)	H	9 µl	1,2 µM	3 miljoner
	HE	9 µl	1,2 µM	
	H ₂ DCFDA	9 µl	60 µM	
Test 3 (ROS aktiverad)	H	9 µl	1,2 µM	3 miljoner
	HE	9 µl	1,2 µM	
	H ₂ DCFDA	9 µl	60 µM	
	MEN	3 µl	200 µM	
Test 4 (Mitokondriell membranpotential)	JC-1	0,5 µl	3 Mm	5 miljoner

H - Hoechst 33258, H₂DCFDA – Divätedichlorofluoresceindiacetat, HE – Hydroethidine , JC-1 - 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodiden , MEN - Menadione/ 2-metyl-1,4-naphthoquinon , PI - Propidium jodid , ROS – Reaktiva Syreföreningar

Samtliga prover analyserades med LSR flödescytometer med standardoptik (BD Biosciences, Becton Dickinson, San José, CA, USA). I test 1-3 räknades 50 000 spermier och i test 4 räknades 30 000 spermier. Resultatet visades i diagram där varje spermie representeras av en punkt. Test 1 delades in i tre olika områden vilka visade levande, döende respektive döda spermier.

Test 2 och 3 delades in sju olika områden, se Tabell 2.

Test 4 delades in i två områden vilka visade mitokondrier med hög respektive låg membranpotential. Samtliga resultat bearbetades och presenterades i dataprogrammet CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA, USA).

Tabell 2 Resultatet från ROS-analyserna presenteras i sju områden (R2-R8) beroende på vilka färgämnen som fluorescerar vid flödescytometri

Område	Typ av spermier	Färgämne		
		H	HE	H ₂ DCFDA
R2	Levande negativa för superoxid			
R3	Levande positiva för superoxid		+	
R4	Döda	+		
R5	Levande negativa för väteperoxid			
R6	Levande positiva för väteperoxid			+
R7	Döda negativa för väteperoxid	+		
R8	Döda positiva för väteperoxid	+		+

Färgämnen: H - Hoechst 33258. HE – Hydroethidine. H₂DCFDA -Divätedichlorofluoresceindiacetat

2. Insemineringsförsök

Utförande

Av de 14 hingstar som ingick i *in vitro assay* försöket, användes fem till insemineringsförsöket. Försöket pågick under två brunstcyklar där varje sto i den ena brunsten inseminerades med SLC-selektad sperma och i den andra med rutinspädd sperma (slumpvist urval). Varje enskilt sto var sin egen kontroll.

Morfologi och progressiv motilitet

Utfördes på samma sätt som i delförsök 1, (*In vitro assay*) ovan.

Grundprov

SLC utfördes inom 1-6h efter spermasamling. I de fall SLC utfördes på stuteriet gjordes detta enligt tidigare beskriven metod av personal, som lärt sig att utföra SLC-metoden. Därefter transporterades sperman kylförvarad vid ca +6°C med posten. I övriga fall (närliggande stuterier) hämtades sperman på stuteriet och SLC utfördes på SLU. Sperman förvarades

kylskåpskallt (+6°C) tills dagen efter för att efterlikna den temperatur som sperma transporteras vid. Analyser gällande koncentration och motilitet gjordes före inseminering.

Sto

Samtliga sex ston var av rasen varmblodig travare och 5-17 år gamla. Stona hade genomgått en allmän klinisk undersökning och ansågs inte ha några sjukdomar av betydelse för försöket. Ultraljudsmaskinen som användes i försöket var av märket Esaote Piemedical, AquilaPro försedd med en 6 MHz probe.

Förkontroll

Stona brunstkontrollerades med hjälp av en "teaser-hingst". Under brunsten rektaliserades de och undersöktes även med ultraljud var till varannan dag för att undersöka äggstocksaktivitet. Vid högbrunst och nära ovulation undersöktes stona en gång dagligen.

Inseminering

Inseminering skedde när folliklar bedömdes vara mogna för ägglossning (storlek ca 3,5-4,5mm i diameter), samt närvaro av brunstödem, öppen cervix och uppvisande av tydliga brunsttecken för hingst. Stona inseminerades med en standarddos på 500×10^6 spermier (10-20ml med en koncentration $50-100 \times 10^6$ spermier/ml) med undantag för en inseminering där en dos med bara 220×10^6 spermier fanns tillgänglig. Alla ston inseminerades 20-24h efter spermasamling. Stona inseminerades med ocentrifugerad rutinspädd sperma i ena omgången och med SLC-selektad sperma i andra omgången. Målet var att i varje semineringsomgång inseminera hälften av stona med ocentrifugerad och den andra hälften med SLC-selektad sperma.

Om stoet beräknades att ovulera då sperma inte var tillgänglig, exempelvis på grund av storhelg, behandlades stona med humant choriongonadotropin, hCG (Pregnyl®, Merck Sharp & Dohme AB) för att inducera ovulation tidigare. Kriterierna för behandling med hCG av dessa ston var förekomst av en dominant follikel över 3,5cm i diameter, som bedömdes fortfarande växa och att stoet var minst två dagar in i brunst.

Efterkontroll

Stona rektaliserades och undersöktes med ultraljud 12-24h efter insemination för att kontrollera att ovulation skedde inom 24h efter inseminering. De ston som uppvisade vätska i livmodern 12-24h efter inseminering sköljdes med 1000ml koksalt intrauterint samt behandlades med oxytocin (Hipracin®, Nordvacc Läkemedel AB) intramuskulärt.

Ny undersökning med ultraljud utfördes efter 16-17 dagar för dräktighetskontroll. De ston som var dräktiga, det vill säga hade en embryonal blåsa av normal storlek, behandlades med prostaglandinpreparat (Dinolytic®, Orion Pharma Animal Health) för att inducera luteolys och därmed abort. Ston där ingen fosterblåsa hittades 16-17dagar efter inseminering undersöktes igen efter två dagar.

All hantering av ston och inseminering gjordes enligt standardrutin på stuterier.

Statistik

All data från CellQuest och SpermVision överfördes till excelfiler som sedan användes för statistiska analyser enligt Mixed-modell (generalized linear model, GLM).

RESULTAT

Resultatet presenteras under två olika rubriker, 1) In vitro assay och 2) Insemineringsförsök. Korrelation (r) och signifikans (p) anges både under tabell samt i löpande text. Signifikanta skillnader har satts vid $p < 0,05$. Vid resultat med $p=0,05-0,10$ har dessa tagits upp om relevanta och angetts som tendens till signifikans.

1. In vitro assay

På grund av olika anledningar gick det inte att få fyra ejakulat från var och en av de olika hingstarna. Sammanlagt 58 ejakulat från 14 olika hingstar analyserades. Två ejakulat fick uteslutas från studien på grund av orenhet eller alltför låg koncentration. För antal analyserade ejakulat se Tabell 3.

Tabell 3. Antal ejakulat som analyserats per hingst

Antal ejakulat	Hingst
1	1,2,3,4
2	5,6,7,8,9
3	10*, 11,12,13
4	14*

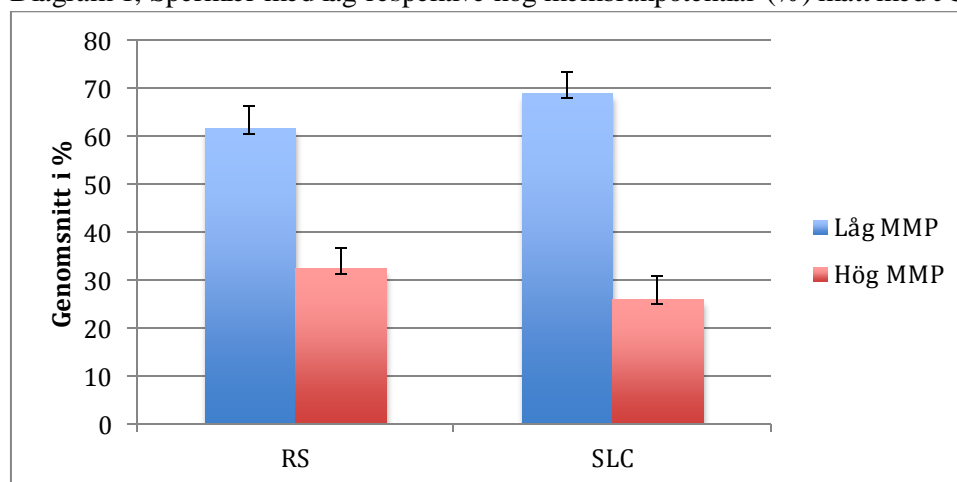
*Ett av ejakulaten från dessa hingstar analyserades bara ocentrifugerat på grund av otillräcklig volym för att utföra SLC.

Totalt analyserades 58 prover med avseende på motilitet, viabilitet, ROS produktion och mitokondriell membranpotential; 30 ejakulat ocentrifugerad/rutinspädd sperma (RS), samt 28 ejakulat efter SLC.

Mitokondriell membranpotential

Centrifugeringen enligt SLC hade ingen signifikant effekt på mängden mitokondrier med låg respektive hög membranpotential och ingen skillnad sågs mellan de ocentrifugerade och de centrifugerade proverna. Andelen spermier med låg membranpotential var lägre hos RS jämfört med SLC-sperma, men det fanns ingen signifikant skillnad mellan grupperna (se Diagram 1).

Diagram 1, Spermier med låg respektive hög membranpotential (%) mätt med JC-1

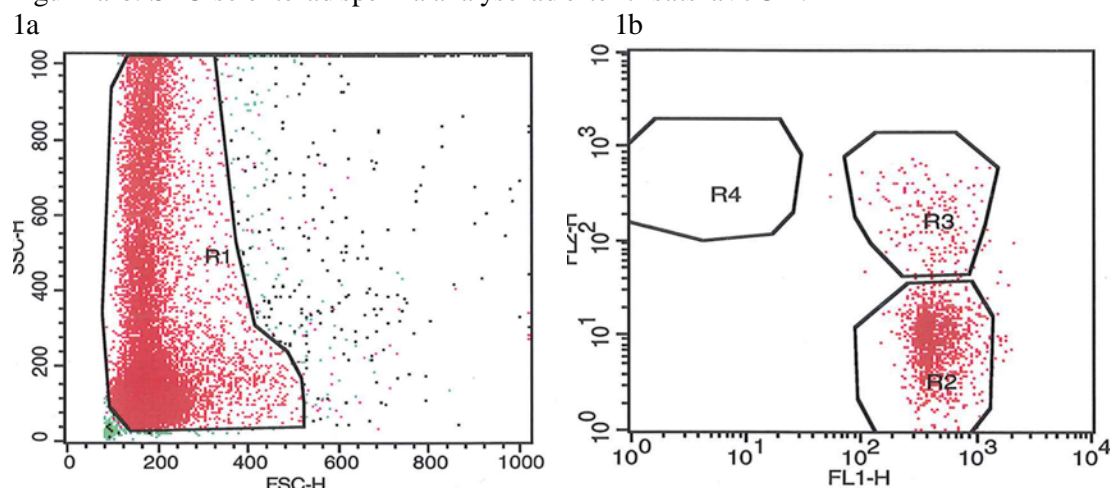


MMP- Mitokondriell Membranpotential. RS- Rutinspädd/ocentrifugerad sperma. SLC- Single Layer Centrifugation. JC-1 = 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodiden.

Hingst hade en signifikant effekt på andelen spermier med låg membranpotential ($p=0,0162$), samt på andelen spermier med hög membranpotential ($p=0,0216$). SLC hade ingen signifikant effekt på andelen spermier med hög respektive låg membranpotential.

I programmet CellQuest, där den analysen av den mitokondriella membranpotentialen från flödescytometern tolkades, sågs tre olika fält. Dessa tre fält representerar analyserade spermier (R1), spermier med låg membranpotential (R2) och spermier med hög membranpotential (R3), se figur 1a-b. Fältet R4 användes inte i detta försök.

Figur 1a-b. SLC-selekterad sperma analyserad efter tillsats av JC-1.



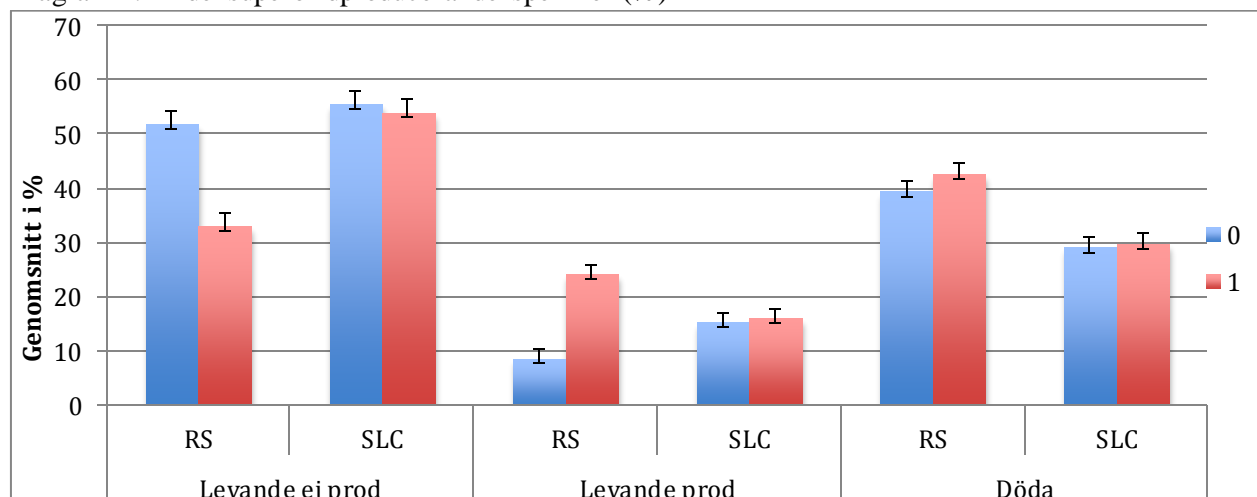
R1- analyserade spermier. R2 - spermier med låg membranpotential. R3 – spermier med hög membranpotential. R4 – användes ej i detta försök.

ROS-produktion

Produktion av Superoxid, O_2^-

Vid stimulering med Menadione (MEN) visade den ocentrifugerade sperman (RS) en signifikant minskning ($p<0,0001$) av de icke superoxidproducerande spermerna. SLC-sperman var stabil i sin superoxidproduktion även efter MEN-stimuleringen och ingen signifikant minskning kunde ses. MEN-stimuleringen samt centrifugeringen hade en signifikant påverkan ($p<0,0001$) på andelen superoxidproducerande spermier. SLC hade en signifikant effekt på responsen på MEN-stimuleringen vilket innebär att enbart RS-proverna visade en signifikant skillnad före respektive efter MEN-stimulering ($p=0,0005$), se Diagram 2.

Diagram 2. Andel superoxidproducerande spermier (%)



RS – rutinspädd, ocentrifugerad sperma. SLC (Single Layer Centrifugation) selekterad sperma. 0 – Ej stimulerade med MEN. 1 – Stimulerade med MEN. Levande ej prod = Levande spermier som inte producerar O_2^- . Levande prod = Levande spermier som producerar O_2^- . Döda = Döda spermier.

En signifikant ökning ($p < 0,0001$) av de spermier som producerade superoxid uppmättes i RS-gruppen efter stimulering med MEN. Det fanns en tendens ($p = 0,066$) till skillnad mellan andelen superoxidproducerande spermier hos RS respektive SLC innan stimulering. SLC-sperman förblev stabil även efter stimulering med MEN. Stimuleringen hade en signifikant effekt ($p < 0,0001$) på resultatet, det vill säga produktionen av superoxid ökade efter stimuleringen. Centrifugeringen hade en signifikant effekt på stimuleringen ($p < 0,0001$), vilket innebar att de centrifugerade proverna förblev stabila i sin superoxidproduktion medan de ocentrifugerade fick en signifikant ökning i superoxidproduktionen.

Centrifugeringen hade signifikant effekt ($p < 0,0001$) på antal döda spermier (se Tabell 4). Det var även en signifikant skillnad ($p < 0,0001$) mellan hingstar avseende mängden döda spermier.

Tabell 4. Skillnader i spermernas O_2 -produktion före och efter centrifugering samt resultat av stimuleringen med MEN.

O_2 produktion	Signifikant skillnad mellan RS/SLC sperma	Signifikant skillnad efter stimuleringen med MEN hos RS	Signifikant skillnad efter stimulering med MEN hos SLC
Levande spermier, inte O_2 producerande	-	minskning ***	-
Levande spermier, O_2 producerande	Lägre andel hos RS *	ökning ***	-
Döda spermier	Färre döda hos SLC ***	-	-

* $p = 0,0660$. *** $p < 0,0001$.

RS- Rutinspädd/ocentrifugerad sperma. SLC- Single Layer Centrifugation. MEN- Menadione/ 2-metyl-1,4-naphthoquinon. Hos SLC-sperman sågs ingen signifikant förändring i superoxidproduktionen efter stimulering med MEN. RS-sperman fick signifikant högre superoxidproduktion efter stimulering.

Produktion av Väteperoxid, H_2O_2

Hos både levande och döda spermier hade centrifugeringen och stimuleringen med MEN en signifikant effekt på resultatet (se Tabell 5).

Tabell 5. Effekt på spermernas H_2O_2 -produktion före/efter centrifugering enligt SLC samt för/efter stimulering med MEN

H_2O_2 produktion	Effekt av centrifugeringen	Effekt av stimuleringen	Centrifugeringens effekt av stimuleringen
Levande spermier, ej producerande	Lägre RS ***	Lägre SLC ***	SLC Lägre efter stim **
Levande spermier, producerande	Lägre SLC ***	Högre SLC ***	SLC högre efter stim ***
Döda spermier, ej producerande	Lägre RS ***	Lägre SLC ***	SLC lägre efter stim *
Döda spermier, producerande	Lägre SLC ***	Högre SLC ***	-

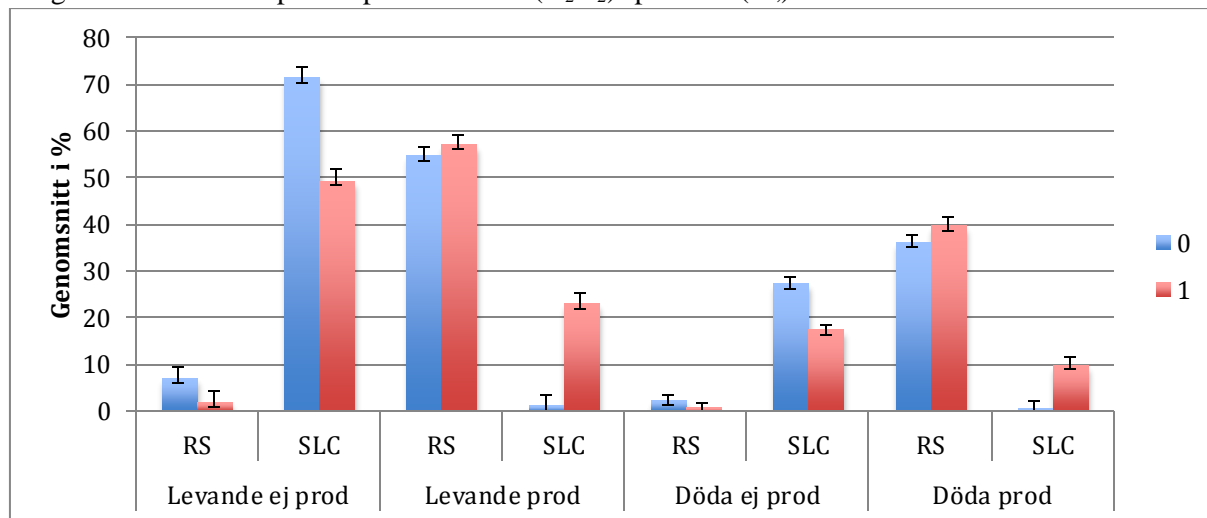
H_2O_2 . Väteperoxid. RS- Rutinspädd/ocentrifugerad sperma. SLC- Single Layer Centrifugation.

*** = $p<0,0001$. **= $p<0,0002$. *= $p<0,0004$.

RS-sperman var stabil i sin väteperoxidproduktion före/efter stimulering. Centrifugeringen selekterade fram signifikant lägre andel väteperoxidproducerande spermier. SLC-sperman fick signifikant ökade väteperoxidnivåer efter stimulering.

I samtliga H_2O_2 analyser visade sig centrifugeringen ha en signifikant påverkan på spermens H_2O_2 produktion. Stimuleringen med MEN visade olika effekt för RS-sperma och SLC-selektad sperma. För de icke H_2O_2 -producerande spermerna sågs ingen signifikant minskning av H_2O_2 produktion i RS proven efter stimulering med MEN, till skillnad från den SLC-selektade sperman där en tydlig sänkning sågs ($p<0,0001$). Motsatsen sågs hos den SLC-selektade sperman där den visade en signifikant mindre andel H_2O_2 produktion samt en signifikant ökning efter stimulering. Det fanns även en signifikant skillnad mellan RS och SLC-selektade spermier avseende levande och döda vare sig de producerade H_2O_2 eller inte (se Diagram 3, samt Tabell 6).

Diagram 3. Andel väteperoxidproducerande (H_2O_2) spermier (%).



RS – rutinspadd, ocentrifugerad sperma. SLC (Single Layer Centrifugation) selekterad sperma. 0 – Ej stimulerade med MEN. 1 – Stimulerade med MEN.

Levande ej prod = Levande spermier som inte producerar O_2^- . Levande prod = Levande spermier som producerar O_2^- . Döda = Döda spermier

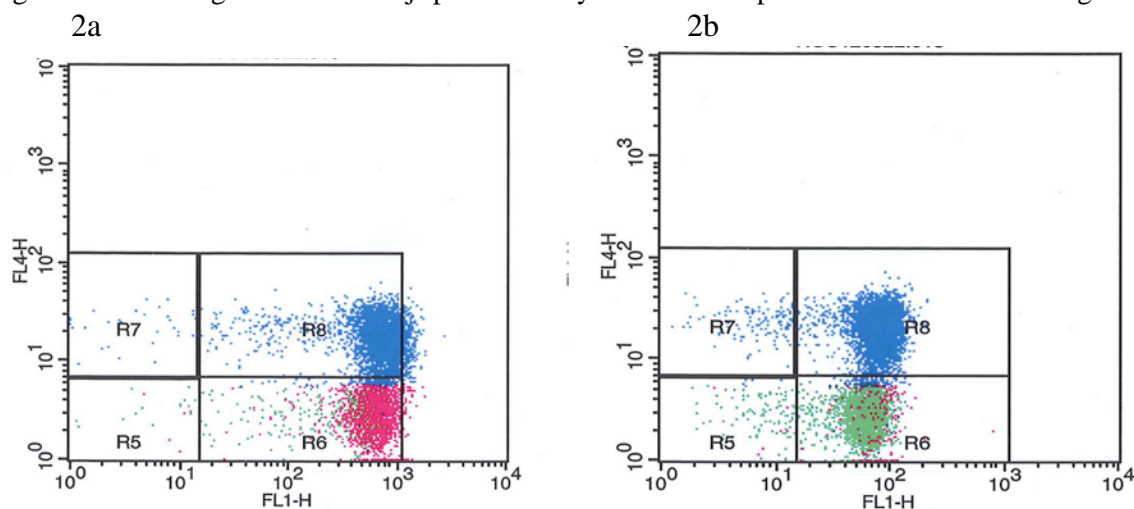
Tabell 6. Skillnader i spermernas H_2O_2 -produktion mellan RS och SLC sperma samt före/efter stimulering med MEN

H_2O_2 produktion	Signifikant skillnad mellan RS/SLC	Signifikant skillnad efter stimuleringen med MEN hos RS	Signifikant skillnad efter stimulering med MEN hos SLC
Levande spermier, ej producerande	Högre SLC ***	-	Lägre efter stim ***
Levande spermier, producerande	Lägre SLC ***	-	Högre efter stim ***
Döda spermier, ej producerande	Högre SLC ***	-	Lägre efter stim ***
Döda spermier, producerande	Lägre SLC ***	-	Högre efter stim ***

RS – rutinspadd, ocentrifugerad sperma. SLC (Single Layer Centrifugation) selekterad sperma.. *** = $p < 0.0001$. RS-proverna visade inte på några signifikant förändrade väteperoxidnivåer efter MEN-stimulering.

I programmet CellQuest sågs en tydlig högerförskjutning på grund av ökad produktion av ROS efter stimulering med MEN. Vid förekomst av H_2O_2 fluorescerar färgämnet i spermerna grönt medan förekomst av O_2 fluorescerar rött. Döda celler fluorescerar blått. Figur 2-3 visar samma hingst före och efter centrifugering samt före och efter stimulering med MEN.

Figur 2a-b. Mätning av ROS med hjälp av flödescytometri i RS sperma hos en undersökt hingst.

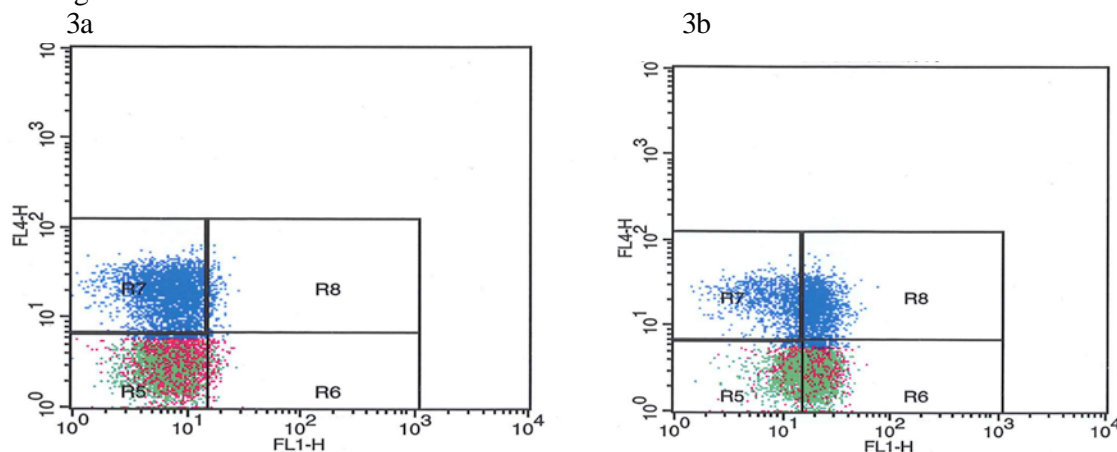


2a = ROS produktion hos RS-sperma innan stimulering med MEN

2b = ROS produktion hos RS-sperma efter stimulering med MEN

R5 levande ej H_2O_2 producerande. R6 levande H_2O_2 producerande. R7 döda ej H_2O_2 producerande. R8 döda H_2O_2 producerande. ROS= reaktiva syreföreningar.

Figur 3a-b. Mätning av ROS med hjälp av flödescytometri efter SLC-selektering hos samma hingst som i figur 2.



3a = ROS produktion hos SLC-selektad sperma innan stimulering med MEN

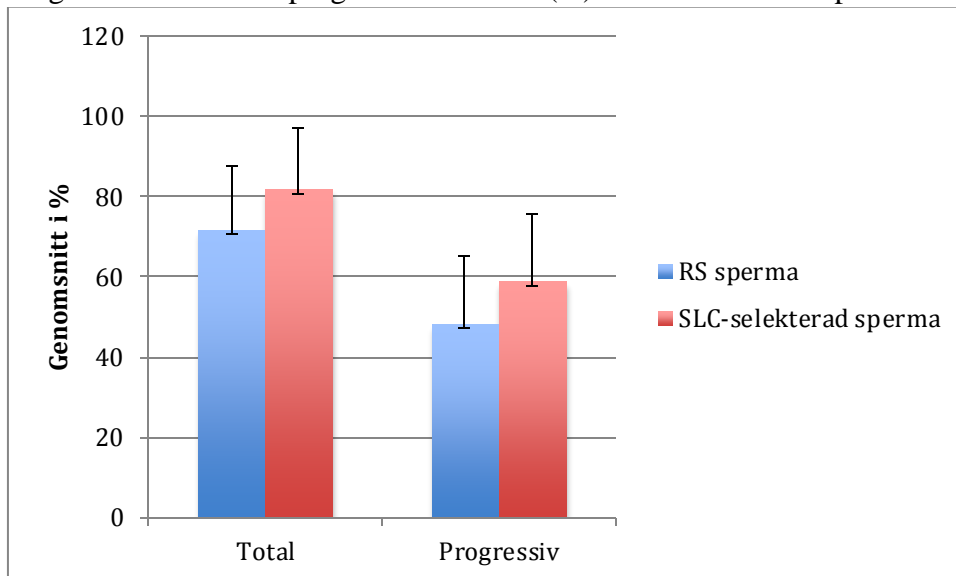
3b = ROS produktion hos SLC-selektad sperma efter stimulering med MEN

R5= levande ej H_2O_2 producerande. R6= levande H_2O_2 producerande. R7= döda ej H_2O_2 producerande. R8= döda H_2O_2 producerande. ROS= reaktiva syreföreningar.

Motilitet och viabilitet

I genomsnitt förbättrades sperman genom SLC-selekteringen gällande både den totala samt progressiva motiliteten (se diagram 4). Centrifugeringen förbättrade både den totala samt progressiva motiliteten signifikant ($p=0,0013$ respektive $p=0,0011$). Centrifugeringen hade effekt oberoende av hingstvariabeln.

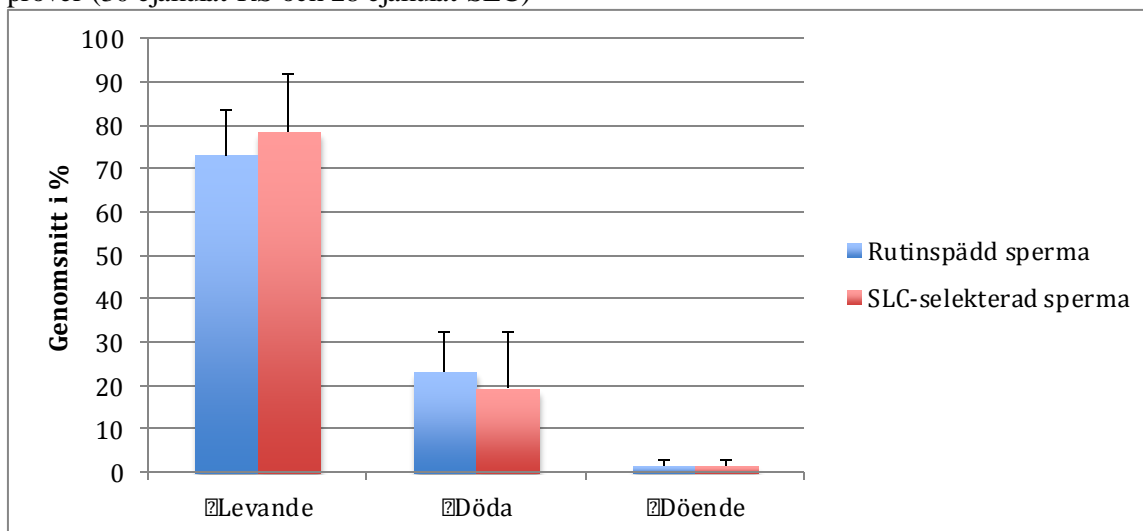
Diagram 4. Total och progressiv motilitet (%) hos RS och SLC sperma.



RS- Rutinspädd/ocentrifugerad sperma. SLC- Single Layer Centrifugation

Centrifugeringen hade en effekt på andelen levande spermier med en tendens till signifikant ökning av viabilitet hos SLC-selekterade prover ($p=0,058$). Andelen döda spermier var signifikant lägre i de SLC-selekterade proverna ($p=0,0354$). Ingen signifikant skillnad sågs mellan RS och SLC-selekterad sperma gällande andelen döende spermier (se diagram 5).

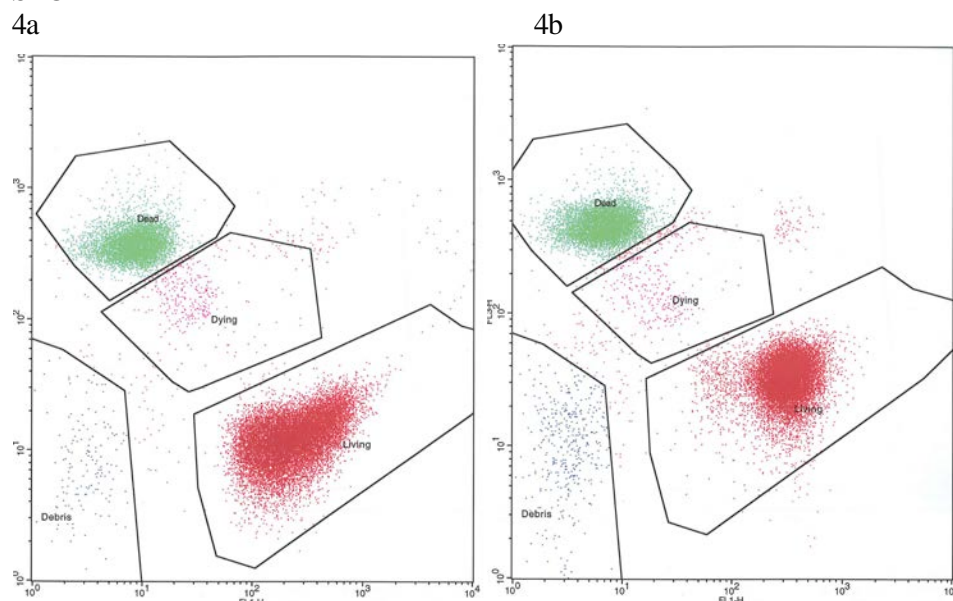
Diagram 5. Andel (%) levande, döda och döende spermier efter färgning med SYBR14/PI för samtliga prover (30 ejakulat RS och 28 ejakulat SLC)



SLC selekterade för signifikant lägre andel döda spermier ($p=0,0354$) samt en tendens till ökad viabilitet ($p=0,058$).

I programmet CellQuest, där viabilitetsmätningarna från flödescytometern tolkades, ses fyra olika fält. Dessa fyra fält representerar levande, döda och döende spermier samt debris. Figur 4a-b visar viabilitetsanalys hos samma hingst före och efter centrifugering. Hos den SLC-selekterade sperman syns ett större fält med levande spermier samt färre debris. Figur 4a-b visar viabilitetsanalys hos samma hingst före och efter centrifugering. Hos den SLC-selekterade sperman syns ett större fält med levande spermier samt färre debris.

Figur 4a-b. Viabilitetsanalys med flödescytometri på samma hingst före och efter centrifugering enligt SLC



Figur 4a SLC-selektat sperm. Figur 4b - RS-sperma

2. Insemineringsförsök

Av olika anledningar gick det inte att göra insemination med både rutinspädd och SLC-sperma från samma hingst på alla ston. Därför planerades försöket om så att varje sto skulle insemineras med samma hingst och att centrifugeringen skulle vara den enda skiljande faktor på stonivå, men inte heller detta gick att genomföra. Då det pågick ett annat långtidsförsök gällande befruktningsförmågan hos den SLC-selektade sperman bestämdes det trots hingstproblemet att insemineringsförsöket skulle fortgå, som en del i det större försöket. I försöket användes rutinspädd/ocentrifugerad sperma (RS) och SLC-selektat sperm från varje hingst.

Endast ett av stona (nr 1) skiljde sig mellan inseminationsomgångarna och konstaterades dräktigt efter insemination med SLC-selektat sperm (se Tabell 7). Eftersom få ston och sperm från flera olika hingstar ingick i studien gjordes inga statistiska analyser. Sperm från två av de fem hingstar, som användes i försöket, resulterade inte i någon dräktighet alls.

Tabell 7. Dräktighetsresultat efter insemination med SLC-selektat sperm respektive rutinspädd sperm uppdelat per sto

Sto	SLC-selektat sperm	Rutinspädd sperm
1	Dräktig	Ej dräktig
2	Dräktig	Dräktig
3	Ej dräktig	Ej dräktig
4	Ej dräktig	Ej dräktig
5	Dräktig	Dräktig
6	Dräktig	Dräktig

RS- Rutinspädd/ocentrifugerad sperm. SLC- Single Layer Centrifugation

DISKUSSION

Även om korrelationen mellan motilitet och befruktningsförmåga varierar mellan studier (Love, 2011) är det känt att spermier aktivt måste ta sig förbi olika barriärer i livmodern för att nå befruktningsplatsen (Troedsson et al., 1998). För att spermier ska kunna förbli motila behövs energi i form av ATP, vilket produceras i mitokondrierna (Kadenbach, 2009). I studier med humana spermier har påvisats en korrelation mellan mitokondriell membranpotential ($\Delta\Psi_m$) och motilitet och det har föreslagits att detta skulle kunna vara ett bra sätt att objektivt avgöra spermiers befruktningsförmåga (Kasai et al., 2002). Studier med hingstspermier har visat att tillsättning av det lipofila ämnet JC-1 även skulle kunna vara en bra metod för att avgöra mitokondriens funktion då den skiljer mellan hög respektive låg $\Delta\Psi_m$ (Gravance et al., 1999). Då SLC-selekterad sperma i tidigare studier har visats ha bättre motilitet än ocentrifugerad sperma från samma ejakulat hade det varit väntat att se en högre mitokondriell aktivitet hos SLC sperman på grund av den ökade energiåtgången. I denna studie sågs emellertid ingen signifikant skillnad mellan ocentrifugerad och SLC-selekterad sperma gällande $\Delta\Psi_m$.

Humanstudier har visat att spermier med hög $\Delta\Psi_m$ hade något lägre motilitet jämfört med de med medelhög $\Delta\Psi_m$ (91,1 respektive 94,0%) medan andelen hyperaktiva spermier var fler hos de med hög $\Delta\Psi_m$ än hos de med medelhög $\Delta\Psi_m$ (27,3 respektive 13,8%). Denna skillnad visade sig vara signifikant korrelerad med $\Delta\Psi_m$ (Kasai et al., 2002). Liknande resultat sågs även i denna studie där den ocentrifugerade sperman visade lägre motilitet, men högre genomsnittlig $\Delta\Psi_m$, även om detta bara sågs som en signifikant skillnad gällande motilitet i de olika grupperna. I en studie utförd av Giannoccaro et al., (2009) sågs inte heller någon korrelation mellan $\Delta\Psi_m$ och andra funktionella parametrar såsom motilitet. Detta kan antyda att även om tillsats av JC-1 är en känslig metod för att utvärdera den mitokondriella funktionen, är spermiers motilitet och befruktningsförmåga mer komplex än bara energiproduktionen. I denna studie användes hingstar utan tidigare kända fertilitetsproblem och det skulle också kunna vara en av förklaringarna till varför det i studien inte sågs någon signifikant skillnad mellan grupperna.

Kadenbach (2010) visade att det är väldigt viktigt att celler håller $\Delta\Psi_m$ på en lägre nivå, då högre nivåer av $\Delta\Psi_m$ ökar protonläckaget genom membranet och därmed även ROS-nivåerna. För att mitokondrien ska kunna producera ATP behövs en membranpotential på mellan 100 och 150mV. Redan vid en $\Delta\Psi_m$ över 130mV börjar den passiva permeabiliteten av protoner/protonläckaget att öka exponentiellt. Enda sättet för en cell att producera ATP utan att samtidigt höja ROS-nivåerna är att förbruka den ATP som har skapats i samma takt som den producerats. Det vill säga när ATP produceras ökar $\Delta\Psi_m$ vid transporten genom elektrontransportkedjan, men genom att förbruka ATP som nyss bildats kommer $\Delta\Psi_m$ att minska utan bildande av ROS. Vid $\Delta\Psi_m$ över 240mV anses protonpumpning och protonläckage vara lika stora vilket leder till att väldigt höga ROS-nivåer bildas (Kadenbach 2010). Detta skulle också kunna antyda att hög $\Delta\Psi_m$ kan vara en risk eftersom spermier är känsliga för ROS. Det framgår inte vid vilka mV som JC-1-testet bildar monomerer respektive aggregat i mitokondrierna och därmed inte heller vid vilka mV testet särskiljer på låg respektive hög $\Delta\Psi_m$. Även om tillsats av JC-1 fortfarande är en väldigt känslig metod för att avgöra skillnader i hög respektive låg $\Delta\Psi_m$ har inga korrelationer mellan låg/hög $\Delta\Psi_m$ och motilitet setts. Det skulle även kunna vara så att den kraftiga produktionen av ROS påverkar mätningen av $\Delta\Psi_m$ genom JC-1 på grund av att superoxid stannar kvar inne i mitokondrien medan väteperoxid tar sig ut genom membranet. Det är oklart om detta kan leda till ytterligare en spänning som höjer $\Delta\Psi_m$. Då SLC-sperman svarade bra på MEN-

stimulering och därmed började producera signifikant högre nivåer av väteperoxid än innan stimulering skulle en mätning av $\Delta\Psi_m$ efter en sådan stimulering kunna ge ledtrådar till huruvida ändringar till höga väteperoxidnivåer även leder till högre $\Delta\Psi_m$.

Det skulle kunna vara så att SLC, på grund av den aktiva transporten som krävs genom kolloiden, selekterar de spermier som bäst kan producera och använda sitt ATP. Genom att de förbrukar ATP i den takt den produceras bildas heller inte de farliga ROS som leder till en fientlig miljö under förvaring/transport. Eftersom SLC-selekterad sperma har en signifikant bättre total- och progressiv motilitet än ocentrifugerad spermier visar det på att SLC-spermier har en god förmåga att använda sitt ATP. Samma typ av spädningsvätska användes till alla proverna, vilket innebär att det inte fanns någon skillnad i mängden glukos tillgänglig för spermerna. Eftersom glukoshalten i spädningsvätskan var densamma borde det ATP som användes komma från spermens mitokondrier.

ROS behövs i låga nivåer för spermens kapacitering, akrosomreaktion och interaktionen med oocyten. Spermernas antioxidantiska förmåga kan hantera och ta hand om en viss nivå av ROS och oskadliggöra dessa. Det är när halten ROS överstiger denna nivå som ROS blir skadlig för cellen och leder till oxidativ stress (Ramalho-Santos et al., 2009). Majoriteten av ROS som produceras i mitokondrierna anses vara superoxid. Superoxiden i sig är en icke reaktiv förening på grund av dess negativa laddning. Denna laddning gör även att den inte kan transporteras några längre sträckor då den inte tar sig igenom varken mitokondriens- eller cellens membran. Majoriteten av superoxiden som bildas i mitokondrien, omvandlas direkt med hjälp av superoxid dismutase (SOD), som finns i mitokondriens matrix, till väteperoxid. Väteperoxiden är en oladdad ROS, vilket gör att den lättare kan ta sig igenom cellmembran, till skillnad från superoxiden (Starkov, 2010). Om en högre $\Delta\Psi_m$ leder till läckage av protoner skulle detta troligen även innebära en ökad omvandling av superoxid och därmed höga väteperoxidnivåer. Den SLC-selekterade sperman i denna studie visade på högre superoxidnivåer än den ocentrifugerade sperman. Men trots den höga superoxidnivån hade lite omvandling skett till väteperoxid och en signifikant lägre nivå av väteperoxid sågs hos den SLC-selekterade sperman. Eftersom SLC-selekterade spermier svarar på stimuleringen med MEN visar detta att de kan producera väteperoxid. Vår studie visade att trots att SLC-spermier har förmågan att bilda ROS omvandlades den sällan från superoxid till väteperoxid. Tidigare studier har visat att avlägsnandet av döda spermier kraftigt ökat överlevnadstiden hos övriga spermier (Johannisson et al., 2009). Detta har ansetts bero på att döda spermier är en stor källa till ROS. Emellertid visade studier av Kadenbach (2010) att hyperaktiva spermier ledde till en stor produktion av ROS och skulle därför också kunna påverka övriga spermiers överlevnadstid.

Eftersom ROS har visats ha en stor betydelse för skador och överlevnad hos spermier skulle detta kunna vara en anledning till att SLC-sperman har en betydligt längre överlevnadstid än ocentrifugerad sperma. SLC hämmar bildning av ROS både genom att selektera bort döda spermier och eventuellt även genom att selektera de spermier med effektiv ATP produktion och konsumtion. Detta skulle kunna vara anledningen till varför SLC-selekterad sperma inte producerar samma nivåer H_2O_2 trots att de bevisligen innehar förmågan att göra så. Även efter stimulering med MEN kommer SLC-sperman inte upp i samma nivåer av väteperoxid, H_2O_2 , som ocentrifugerade spermier. Detta skulle antyda antingen att cellerna inte producerar samma mängder eller att deras antioxidantiska försvar är bättre. Som sagts ovan måste O_2 finnas för att H_2O_2 ska bildas, vilket finns hos SLC-sperman. Men det är bara efter stimulering som en ökning av H_2O_2 ses hos SLC-sperma. Efter stimulering hos SLC-sperma ses inte någon signifikant ökning av O_2 utan bara av H_2O_2 vilket skulle kunna antyda att deras antioxidativa förmåga, eller förmågan att ta tillvara på energin har överstigit.

Fortsatta studier där MEN-stimulerad SLC-selektad sperma analyseras gällande överlevnadstid, med icke stimulerad SLC-selektad sperma som kontroll från samma ejakulat, skulle kunna visa på om ROS produktionen från levande spermier minskar överlevnadstiden.

Det behövs mer forskning för att få kunskap om exakt vilka spermier det är som överlever från betäckning/insemination till befruktningstillfället i äggladaren. SLC selekterar spermier med hög motilitet och viabilitet vilket också innebär att det är en specifik spermiepopulation som finns kvar efter SLC och där majoriteten av debris och immotila spermier från ejakulatet har tagits bort. Under kapaciteringen, vilken krävs för att befruktning ska kunna ske, blir spermien hyperaktiv. Om kapaciteringen sker långt innan insemination kommer dessa spermier att dö och inte kunna förflytta sig till äggladaren. En möjlig teori är att de spermier som selekteras med hjälp av SLC har längre tid kvar tills de kommer genomgå sin kapacitering och därför har en längre överlevnad. När spermien kapaciteras krävs stora mängder ATP, vilket kan leda till att ROS-nivåerna höjs och därmed den oxidativa stressen.

Det hade varit intressant att studera SLC spermernas $\Delta\Psi_m$ och ROS produktion efter 96h då de har förlorat ungefär samma motilitet och viabilitet som ocentrifugerade spermier har efter 24h (Morrell et al., 2008). Detta för att se om de följer samma mönster som ocentrifugerade spermier och därmed kommer uppvisa högre väteperoxidproduktion och högre $\Delta\Psi_m$ än efter 24h, som nu har studerats. Om SLC-sperman skulle uppvisa samma tendenser gällande $\Delta\Psi_m$ och ROS efter betydligt längre tid skulle detta kunna tyda på att de spermier som selekteras fram med SLC är i en tidigare fas i sin livscykel och därmed har en längre överlevnadstid.

Generellt för alla tester som gjordes i denna studie visade sig effekten/resultaten bero mer på centrifugeringen än på de i studien ingående hingstarna. Endast i de fall där centrifugeringen inte var signifikant hade hingsten istället en signifikant effekt. Ett exempel på detta är studierna av den mitokondriella membranpotentialen där centrifugeringen inte hade någon effekt på resultatet, men däremot sågs påverkan av hingst. Det verkar därför som att SLC i många fall jämnar ut skillnaderna mellan olika ejakulat och selekterar ut en specifik population av spermier med bättre motilitet och signifikant lägre väteperoxidproduktion. Eftersom MEN användes i testerna för att stimulera produktion av ROS kunde även förmågan att producera ROS ses. Det mest anmärkningsvärda med MEN-stimuleringen var att trots att SLC-spermier visade på tydligt lägre produktion av väteperoxid hade de en förmåga att producera ROS. Det vill säga de spermier som selekterats vid SLC kan producera väteperoxid, men gör det inte av okänd anledning. Den andel SLC-selektade spermier som producerade väteperoxid innan stimuleringen med MEN var låg, vilket är en intressant iakttagelse eftersom väteperoxid anses vara den mest aggressiva ROS.

I denna studie visade sig mätning av mitokondriell membranpotential med hjälp av JC-1 inte vara en bra metod för att avspegla spermiers potentiella befruktningsduglighet. Däremot så skulle eventuellt mätning av O_2 och H_2O_2 vara bra indikatorer på hur toxisk miljön är för spermerna och därmed indirekt deras överlevnadsförmåga.

Att SLC-selektad sperma är befruktningsduglig har visats i en tidigare studie, och även att den är befruktningsduglig upp till 96h efter spermasamling (Lindahl et al., 2012) vilket skiljer sig avsevärt från rutinspadd sperma där en markant försämring ses av spermiekvaliteten redan 24h efter spermasamling (Aurich, 2005). Skillnader i dräktighetsresultat mellan insemination med rutinspadd respektive SLC-selektad sperma har tidigare enbart studerats hos subfertila hingstar (Morrell et al., 2011). I detta insemineringsförsök ingick för få ston och tillgången

till sperma var för begränsad för att kunna görastatistiska analyser av materialet. Det var bara hos ett av stona som en skillnad sågs i dräktighetsresultat efter insemination med rutinspädd respektive SLC-selekterad sperma. Något som blev tydligt i detta försök är problemen med att få tillgång till sperma vid rätt tidpunkt i förhållande till stoets ovulationstidpunkt. Våren 2012 var kall vilket innebar att stona var sena att komma in i brunst med normala cykler. På seminstationerna kontrolleras stona rutinmässigt på samma dagar som spermabeställning kan göras d.v.s. på måndag, onsdag och fredag i Sverige. I denna studie gjordes även en kontroll på kvällen innan förväntad ovulation samt på morgonen/förmiddag innan inseminering. Eftersom stona alltid kontrollerades med rektal- och ultraljudsundersökning före varje insemination minskades en felkälla eftersom det kunde kontrolleras att stoet inte hade ovulerat före insemination eller ovulerat maximalt 12h innan insemination.

Insemineringsförsöket behöver upprepas med en och samma hingst till samtliga ston för att se om det finns någon signifikant skillnad i dräktighetsresultatet. Alternativt behövs en större studie med större antal ston och hingstar göras så att hingstskillnaderna blir försumbar. I detta försök användes hingstar utan tidigare kända reproduktionsproblem, men tidigare studier har visat att SLC har förbättrat dräktighetsprocenten hos subfertila hingstar.

SLUTSATS

Single Layer Centrifugation selekterar en population av spermier med en signifikant lägre väteperoxidproduktion än ocentrifugerad sperma, detta trots att de efter stimulering visar på förmåga att producera väteperoxid. I likhet med tidigare studier med SLC-selekterad sperma visade detta försök att centrifugeringsmetoden minskar mängden döda spermier. SLC selekterade spermier visade en signifikant skillnad i produktion av superoxid jämfört med rutinspädd, ocentrifugerad sperma. Att mäta mitokondriens membranpotential med hjälp av JC-1 är, trots testets känslighet för skillnader i $\Delta\Psi_m$, inte ett bra sätt att mäta spermiers potentiella motilitet och befruktningsförmåga på.

TACK

Tack till Jane Morrell, min huvudhandledare, för all praktisk hjälp, stöttning och guidning genom detta arbete.

Tack till Anders Johannisson, min bihandledare, för all hjälp i laboratoriet och stöttning.

Tack till Johanna Lindahl och Anne-Marie Dalin, mina bihandledare, för all hjälp med insemineringsförsöket, skrivningsarbetet och stöttning.

Tack till Patrice Humblot för all hjälp med statistiken.

Slutligen tack till seminstationerna och deras personal, samt veterinärer som bidragit med tid och material till denna studie.

REFERENSER

- Alberts B., Bray D., Hopkins K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004). Essential Cell Biology 2nd edition. Published by Garland Science.
- Giannoccaro A., Lacalandra Giovanni M., Filannino A., Pizzi F., Nicassio M., Dell'Aquila M.E., Minervini F. (2009). Assessment of viability, chromatin structure stability, mitochondrial function and motility of stallion fresh sperm by using objective methodologies. *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 4(2), pp. 034-041, February 2010
- ASVH <http://www.asvh.se/avel/siffror-och-statistik> 2012-10-20
- Aurich C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89 65-75.
- Aurich C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107 268-275.
- Aurich J.E., Schönherr U., Hoppe H., Aurich C. (1996). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 48:185-192, 1997.
- Benov L., Szejnberg L., Fridovich I. (1998). Critical evaluation of the use of Hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radical Biological Medicine* 25, 826- 831.
- Cossarizza A., Baccarani-Contrì M., Kalashnikova G., Franceschi C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and Biophysical Research communications*. Vol 197 No 1. Page 40-45
- Criddle D.N., Gillies S, Baumgartner-Wilson H.K., Mohammed J, Chinje E.C., Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko O.V., Tepikin A.V., Sutton R, Petersen O.H. (2006). Menadione-induced reactive Oxygen Species via redox Cycling promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 40485-40492.
- Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P. (1994). Dual Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Journal of Andrology* 15, 620-629.
- Garner D.L., Johnson L.A. (1995). Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction* 53, 276-284.
- Graham J.K. (2001). Assessment of sperm quality. AAEP proceedings, Vol 47. Reprinted in the IVIS website.
- Gravance C.G., Garner D.L., Baumber J., Ball BA. (1999). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 53:1691-1703.
- Johannisson A., Morrell J.M., Thorén J., Jönsson M., Dalin A.M., Rodriguez-Martinez H. (2009). Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science* 116, p119–128

- Kadenbach B., Ramzan R., Wen L., Vogt S. (2010). New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 205-212.
- Kasai T., Ogawa K., Mizuno K., Nagai S., Uchida Y., Ohta S., Fujie M., Suzuki K., Hirata S., Hoshi K. (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl Jun*; 4: 97-103
- Koppers A.J., De Iuliis G.N., Finnie J.M., McLaughlin E.A., Aitken J.R. (2008). Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, August, 93(8):3199–3207
- Lindahl J., Dalin A-M., Stuhmann G., Morrell J. (2012). Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6°C prior to artificial insemination. 2012x
- Love C.C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76, 547–557.
- Macias Garcia B., González Fernández L., Ortega Ferrusola C., Salazar-Sandoval C., Morilla Rodríguez A., Rodríguez Martínez H., Tapia JA., Pena FJ. (2011). Membrane Lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Dom Anim* 46, 141-148.
- Makker K., Agarwal A., Sharma R. (2009). Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 129, April 2009, pp 357-367.
- Morrell J.M., Dalin A.M., Rodríguez-Martínez H. (2008). Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Anim. Reprod.*, v.5, n.3/4, p.121-126, Jul./Dec.
- Morrell J.M., Johannisson A., Strutz H., Dalin A-M., Rodríguez-Martínez H. (2009a). Colloidal Centrifugation of Stallion Semen: Changes in Sperm Motility, Velocity, and Chromatin Integrity during Storage. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol 29, No 1.p 24-32
- Morrell J.M., Johannisson A., Dalin A-M., Rodríguez-Martínez H. (2009b). Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* 72, 879–884
- Morrell J.M., Rodríguez-Martínez H. (2010). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International*. Vol 2001. Article ID 894767.
- Morrell JM, Mari G, Kutvölgyi G, Meurling S, Iacono E, Mislei B, Rodríguez-Martínez H. (2011) Spermatozoa from stallion ejaculates processed by Single Layer Centrifugation with Androcoll™-E are capable of fertilization after artificial insemination. *Reprod Dom Anim*. 46, 642-645.
- Morrell J.M., Phil J., A-M Dalin., Johannisson A. (2012). Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. *Theriogenology* xx

- C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J-P, Mankhetkorn S. (2005)
 . Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug sensitive and drug resistant cancer cells using the 2',7'- dichlorofluorescein diacetate assay. Radiation physics and chemistry 72, 323-331.
- Ramalho-Santos J., Varum S., Amaral S., Mota P.C., Sousa A.P., Amaral A. (2009). Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. Human Reproduction Update, Vol.15, No.5 pp. 553–572.
- Rath D., Schuberth H.J., Coy P., Taylor U. (2008). Sperm interactions from insemination to fertilization. Reprod Dom Anim 43(Suppl. 5), 2-11
- Rota a., Furzi C., Panzani D., Camillo F. (2004). Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. Reprod Dom Anim 39, 103-109.
- Starkov A. 2010. Measurement of Mitochondrial ROS Production. Methods Mol Biol. (2010). 648:245-255. Doi:10.1007/978-1-60761-756-3_16
- Troedsson M.H.T., Liu I.K.M., Crabo B.G. (1998). Sperm transport and survival in the mare . Theriogenology 49:905-915
- Votyakova T.V., Reynolds I.J. (2001). $\Delta\Psi$ m-dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. Journal of neurochemistry. 79. 266-277.